

基于网络药理学和动物实验探究荆防颗粒对高尿酸血症的治疗作用及机制

尉雅洁¹, 刘明飞², 孙成宏^{3,4}, 王伟³, 肖贺^{3,4}, 程国良^{3*}, 陈颖^{1*}

1. 青岛大学附属医院 内分泌与代谢性疾病科, 山东 青岛 266003

2. 中国海洋大学医学院 海洋药物重点实验室, 山东 青岛 266003

3. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276005

4. 鲁南制药集团股份有限公司 临沂市天然药物免疫药理毒理(企业)重点实验室, 山东 临沂 273400

摘要: **目的** 基于网络药理学方法和体内实验验证探讨荆防颗粒治疗高尿酸血症的作用机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)筛选荆防颗粒活性成分对应靶点, 通过 OMIM、GeneCards 和 TTD 等数据库收集高尿酸血症相关靶点。将交集靶点上传至 STRING 数据平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络, 再采用 Metascape 数据平台进行基因本体(gene ontology, GO)功能和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。采用氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠模型和小鼠肾脏代谢组学对网络药理学结果进行验证。**结果** 网络药理学结果表明, 荆防颗粒 109 个成分中含有 500 个相关靶点, 高尿酸血症相关靶点 801 个, 交集靶点 87 个。PPI 网络分析结果显示, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、肿瘤蛋白 p53(tumor protein p53, TP53)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)可能是荆防颗粒治疗高尿酸血症的关键靶点。KEGG 通路富集分析获得凋亡信号通路、坏死性凋亡、低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路等。通过氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症小鼠模型结果显示, 荆防颗粒显著降低血清尿酸、尿素氮及血肌酐水平($P < 0.01$ 、 0.001), 显著抑制肾组织 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、cleaved Caspase-3 蛋白表达($P < 0.01$), 升高 B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白表达($P < 0.05$ 、 0.01)。肾脏代谢组学结果显示, 荆防颗粒能够通过改善高尿酸血症小鼠丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢、糖酵解/糖异生途径、柠檬酸循环等途径改善代谢。**结论** 荆防颗粒能够基于多成分、多靶点、多通路的特点相互协同治疗高尿酸血症。

关键词: 荆防颗粒; 高尿酸血症; 网络药理学; 凋亡; 糖代谢

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)03-0808-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.014

Therapeutic effect and mechanism of Jingfang Granules on hyperuricemia based on network pharmacology and animal experiments validation

YU Ya-jie¹, LIU Ming-fei², SUN Cheng-hong^{3,4}, WANG Wei³, XIAO He^{3,4}, CHENG Guo-liang³, CHEN Ying¹

1. Department of Endocrinology and Metabolism, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China

2. Key Laboratory of Marine Drugs, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

3. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276005, China

4. Linyi Key Laboratory for Immunopharmacology and Immunotoxicology of Natural Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 273400, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒, JF) on hyperuricemia (HUA) based on network pharmacological method and *in vivo* experiments. **Methods** The corresponding targets of active components in JF were screened by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the related targets of HUA were

收稿日期: 2022-11-08

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81600601); 山东省自然科学基金面上项目(ZR2021MH363)

作者简介: 尉雅洁, 女, 硕士, 主要从事内分泌与代谢病机制研究。E-mail: yuyaj1204@163.com

*通信作者: 程国良, 高级工程师, 主要从事中药药理研究。E-mail: cgl.yb@163.com

陈颖, 副主任医师, 主要从事内分泌与代谢病机制研究。E-mail: qdchenying@qdu.edu.cn.

collected by OMIM, GeneCards, TTD and other databases. Intersection targets were upload in STRING data platform to build protein-protein interaction (PPI) network, and Metascape data platform was then used to conduct gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. HUA model induced by oteracil potassium and renal metabolomics of mice were used to verify the results of network pharmacology. **Results** The results of network pharmacology showed that there were 500 targets corresponding to 109 compounds detected by JF, 801 targets matching HUA and 87 intersection target. The results of PPI network analysis showed that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), tumor protein p53 (TP53), tumor necrosis factor (TNF), cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3) and interleukin-6 (IL-6) may be the key targets of JF in treatment of HUA. The apoptotic signaling pathway, necroptosis and hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway were obtained by KEGG pathway enrichment analysis. The results of HUA mouse model induced by oteracil potassium showed that JF significantly reduced the serum uric acid, blood urea nitrogen and serum creatinine level ($P < 0.01, 0.001$), significantly inhibited Bcl-2 associated X protein (Bax) and cleaved Caspase-3 protein expressions in renal ($P < 0.01$), and increased B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression ($P < 0.05, 0.01$). The results of renal metabolomics showed that JF could regulate the metabolism of alanine, aspartic acid and glutamic acid, glycolysis/gluconeogenesis, tricarboxylic acid cycle and other pathways in HUA mice. **Conclusion** JF can treat hyperuricemia synergistically based on the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway.

Key words: Jingfang Granules; hyperuricemia; network pharmacology; apoptosis; glucose metabolism

高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 是由于尿酸生成过多或尿酸排泄减少引起的代谢性疾病, 其患病率逐渐上升, 目前已成为继高血糖、高血脂、高血压后的又一重要的代谢病^[1]。HUA 不仅仅是痛风的重要危险因素, 也会增加肥胖、高血压、糖尿病等代谢综合征发生率, 甚至导致慢性肾损伤、痛风石等, 给人们的生活带来了极大的危害^[2]。研究表明, 尿酸盐作为一种氧化剂, 可以增加线粒体的超氧化物生成, 过多的活性氧生成对线粒体 DNA 产生一定损害从而触发凋亡过程, 诱发肾小管上皮功能障碍^[3], 可见, 慢性尿酸损伤足以引发肾脏细胞凋亡, 导致肾小管损伤、肾小管间质纤维化、肾小球硬化等慢性肾脏病。此外, 体内尿酸的升高将产生大量尿酸钠结晶 (mono sodium urate, MSU), MSU 刺激激活一系列炎症因子转录表达, 这些有害物质最终导致肾脏损伤, 加重凋亡和炎症反应^[4]。目前临床上用于治疗 HUA 的药物常常具有一定的毒副作用且靶向较为单一。中药以其多靶点、多环节的独特优势, 使得研究中药治疗 HUA 具有重大意义。

荆防颗粒源于有“四时瘟疫之通剂”的荆防败毒散, 据明代张时彻的《摄生众妙方》记载, 荆防败毒散处方组成为荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、甘草、桔梗^[5-6]。李建民教授对于慢性肾脏病合并高尿酸血症的最常用的 39 味高频药物进行聚类分析中指出, 黄芪、茯苓、荆芥、防风等药物作为基础用药具有良好功效^[7]。范琢玉等^[8]发现, 甘草素对有机阴离子转运蛋白 4 (organic anion transporter 4, OAT4) 和葡萄糖转运

蛋白 9 (glucose transporter 9, GLUT9) 等有明显抑制作用, 从而促进尿酸排泄, 降低血尿酸水平。而目前, 荆防颗粒在临床上常用于防治流行性疾病, 具有解热镇痛、抗炎、提高免疫、改善肺损伤等功效^[9-12], 但其在抗 HUA 及肾脏保护方面的研究还未见报道。因此本研究将通过网络药理学技术筛选荆防颗粒主要成分治疗 HUA 的作用靶点, 通过氧嗪酸钾诱导的 HUA 小鼠模型验证其靶点及潜在机制, 以期找到多靶点候选药物治疗 HUA 及高尿酸性肾病, 为荆防颗粒的进一步推广及临床应用提供理论支持。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 ICR 雄性小鼠 30 只, 体质量 (25±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2019-0008。动物饲养室温度为 20~25 °C, 相对湿度为 50%~60%, 人工照明在明暗之间交替使用 (12h 光照/12h 黑暗), 自由进食饮水。动物实验经鲁南制药集团股份有限公司实验动物伦理委员会批准 (批准号 HN-IACUC-2022-049)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒 (国药准字 Z37020357, 批号 0012008044) 由山东新时代药业有限公司提供; 别嘌醇 (国药准字 H44021492, 批号 20220121) 由广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂提供; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 氧嗪酸钾购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3

(cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体(批号 9661S) 购自美国 CST 公司; HRP 标记山羊抗兔二抗(批号 ab97080)、HRP 标记兔抗鼠二抗(批号 ab6728)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体(批号 ab182858) 购自英国 Abcam 公司; α -tubulin 抗体(批号 AF2827)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(批号 AF7270) 购自 Beyotime。

1.3 仪器

冷冻离心机(美国 Sigma 公司); Tissue-Tec[®] VIPTM5Jr 型全封闭组织脱水机、Tissue-Tec[®] TECTM5 型组织包埋机(日本樱花检验仪器株式会社); RM2235 型轮转式病理切片机、HI1210 型组织摊片机、ST5020 型自动染色机(德国 Leica 公司); BX53 型生物显微镜(日本 Olympus 公司); BS-800 型全自动生化分析仪(深圳市迈瑞生物医学电子有限公司); DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转移槽(北京六一生物科技有限公司); 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); LTQ-Oribitrap 高分辨质谱联用仪、Vanquish 超高效液相色谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 荆防颗粒的活性成分及其作用靶点筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 和 SwissTarget Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 对梁红宝等^[4]在荆防颗粒成分分析中所得到的 109 个化合物进行靶点收集, 同时通过中国知网(CNKI) 数据库文献检索对上述化合物的靶点进行补充。将药物靶点通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>) 转换为 Gene Symbol, 筛除重复值后得到荆防颗粒相关靶点。

2.1.2 HUA 潜在靶点的获取 分别在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)、TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>) 搜索“hyperuricemia”“HUA”, 检索疾病靶点。

2.1.3 筛选共同靶点 将药物与疾病获得的相关靶点输入 Venn 数据库(<http://www.ehbio.com/test/venn/#/>) 在线平台, 进入 Interactive Venn diagram, 得到共同靶点, 绘制 Venn 图。利用 Cytoscape 3.9.1 软件构建中药-成分-靶点网络图。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein

interaction, PPI) 网络的构建 将获得的药物与疾病的共同靶点上传至 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>), 物种选择设置为“Homo sapiens”, 将获得数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件, 构建 PPI 网络, 分析并预测 PPI 的潜在关系, 结果保存为 TSV 格式。

2.1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将获得的药物与疾病的共同靶点导入至 Metascape 数据库(<http://metascape.org>), 物种选择设置为“Homo sapiens”, 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 通过生物信息学云平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制气泡图。

2.2 动物实验

2.2.1 动物分组及造模给药 将 30 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠按体质量随机分为对照组、模型组及荆防低、高剂量 (1、2 g/kg) 组和别嘌醇 (25 mg/kg) 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余各组每天 ip 250 mg/kg 尿酸氧化酶抑制剂氧嗪酸钾溶液 (10 mL/kg, 溶于 0.5% CMC-Na 溶液), 连续 8 周, 以构建 HUA 模型, 对照组给予等体积的 CMC-Na 溶液。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积纯化水, 每天上午进行造模, 下午给药治疗。

2.2.2 血生化检测 末次给药 2 h 后, 各组小鼠 ip 1% 戊巴比妥溶液麻醉后取血, 3000×g 离心 10 min, 取血清, 用于测定血清尿酸、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血肌酐 (creatinine, Cr) 水平。

2.2.3 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾脏组织病理 取各组小鼠肾脏组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 常规脱水、浸蜡、石蜡包埋并切片 (5 μ m), 进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察各组小鼠肾脏组织病理变化。根据肾小管炎症细胞浸润、管腔坏死和肾小管扩张等来评估组织病理学变化。评分标准: 0 分, 肾小球分布均匀, 无炎性细胞浸润, 肾小管无扩张; 1 分, 肾小球、肾小管结构较清晰, 个别肾小管囊性扩张; 2 分, 部分肾小管、肾间质扩张水肿, 少量炎性细胞浸润; 3 分, 肾小管扩张、肾间质有炎性细胞浸润、充血水肿; 4 分, 肾小球肿胀, 炎性浸润明显, 毛细血管腔不清晰, 肾组织受损较严重, 出现肾小管扩张。

2.2.4 Western blotting 检测肾脏组织 Bax、Bcl-2 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达 取各组小鼠右肾组织, 充分研磨, 在冰冷的 RIPA 裂解缓冲液中裂解 30 min 后, 9000×g 离心 10 min 后取上清, 用 BCA 检测

试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂牛奶,室温封闭 2 h,加入相应一抗 (1 : 1000), 4 ℃ 孵育过夜;用纯化水洗涤后,加入二抗 (1 : 5000),室温孵育 2 h,纯化水洗涤后,加入 ECL 发光试剂显影,利用化学发光成像系统对条带可视化,并用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2.5 肾脏代谢组学 取各组小鼠肾脏组织,按照肾脏组织:叠氮化钠=1 g : 50 μL 比例加入 100 mg/mL 叠氮化钠,取 200 mg 样品加 4 mL 超纯水,进行均质化,涡旋混匀后,再加入 1 mL 80%甲醇水,涡旋震荡 10 min 后,冰浴静置 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,按照 1 : 2 比例加入超纯水稀释,涡旋震荡 30 s,进行 LC-MS 分析。

色谱条件: Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为 0.01%甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B),梯度洗脱: 0~2 min, 95%A; 2~4 min, 95%~45% A; 4~23 min, 45%~40% A; 23~27 min, 40%~0 A; 27~28 min, 100% B; 28~32 min, 0~95% A; 32~34 min, 95% A。体积流量 0.20 mL/min;柱温 40 ℃;进样量 2 μL。

质谱条件: LTQ Orbitrap 串联质谱仪,采用正、负离子检出模式, m/z 100~1500,采集时间为 0~30 min。加热电喷雾离子源 (HESI),正、负离子检

出模式,扫描范围 m/z 50~1800;离子源温度 350 ℃;电离源电压 4 kV;毛细管电压 35 V;管透镜电压 110 V;鞘气和辅助气均为高纯氮气;鞘气体积流量 40 arb,辅助气体积流量 20 arb;数据采集采用傅里叶变换高分辨全扫方式 (分辨率 30 000)、数据依赖性 DDA-MS2、母离子列表 PIL-MS2 等多种采集策略,碰撞诱导裂解 (CID) 条件。

2.2.6 统计学分析 采用 Graphpad Prism 8.0 软件对数据进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行方差齐性检验及正态分布检验。两组间均数比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 “荆防颗粒-化合物-靶点-HUA”网络及 PPI 网络构建

根据梁红宝等^[5]通过 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术对荆防颗粒的化学成分进行鉴定获得的 109 个主要化合物分析,通过 TCMSP 与 SwissTargetPrediction 数据库最终得到相关靶点 500 个;在 GeneCards、OMIM、TTD 数据库中去重后共获得 HUA 相关靶点 801 个,将荆防颗粒与 HUA 共同靶点绘制 Venn 图 (图 1-A),共获得 87 个交集靶点。构建“荆防颗粒-化合物-靶点-HUA”网络 (图 1-B),荆防颗粒治疗 HUA 存在多个化合物作用于同一个靶点,也存在 1 个化合物与多个靶点发生作

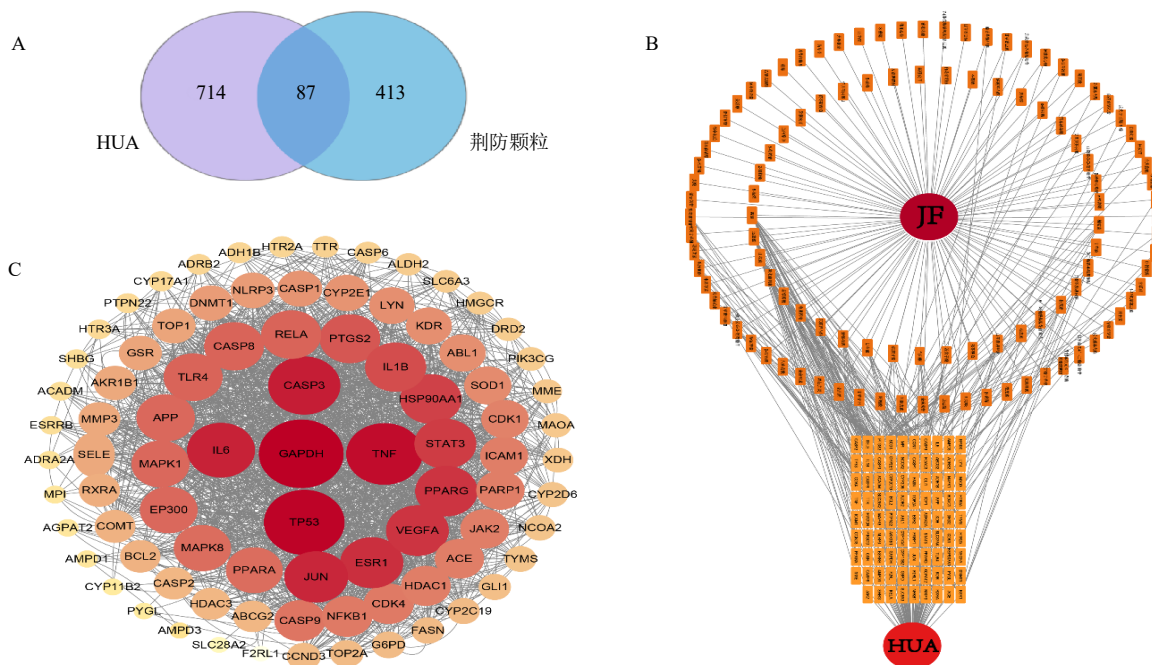


图 1 荆防颗粒与 HUA 靶点交集 Venn 图 (A)、“荆防颗粒-化合物-靶点-HUA”网络 (B) 和 PPI 网络 (C)
 Fig. 1 Venn diagram of intersection of Jingfang Granules and HUA targets (A), “Jingfang Granules-compound-target-HUA” network (B) and PPI network (C)

用的现象。将共同靶点传至STRING数据库构建PPI网络(图1-C),核心靶点包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、Caspase-3、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等,提示荆防颗粒可能通过影响糖代谢与凋亡干预HUA。

3.2 GO功能和KEGG通路富集分析

在进一步探究荆防颗粒治疗HUA的过程中,通过GO功能富集分析,筛选出相关性最高的前10条反应过程(图2),生物进程(biological process,

BP)主要涉及细胞对氮化合物的反应、蛋白质结构域特异性结合过程等;分子功能(molecular function, MF)主要参与膜筏、池体;细胞组成(cellular component, CC)主要涉及防御反应的调节、细胞死亡的正向调控、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联调节等。表明荆防颗粒可能通过参与多种生物调控过程治疗HUA。KEGG通路富集分析(图3)主要涉及脂质与动脉粥样硬化、凋亡信号通路、坏死性凋亡、缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)信号通路等。

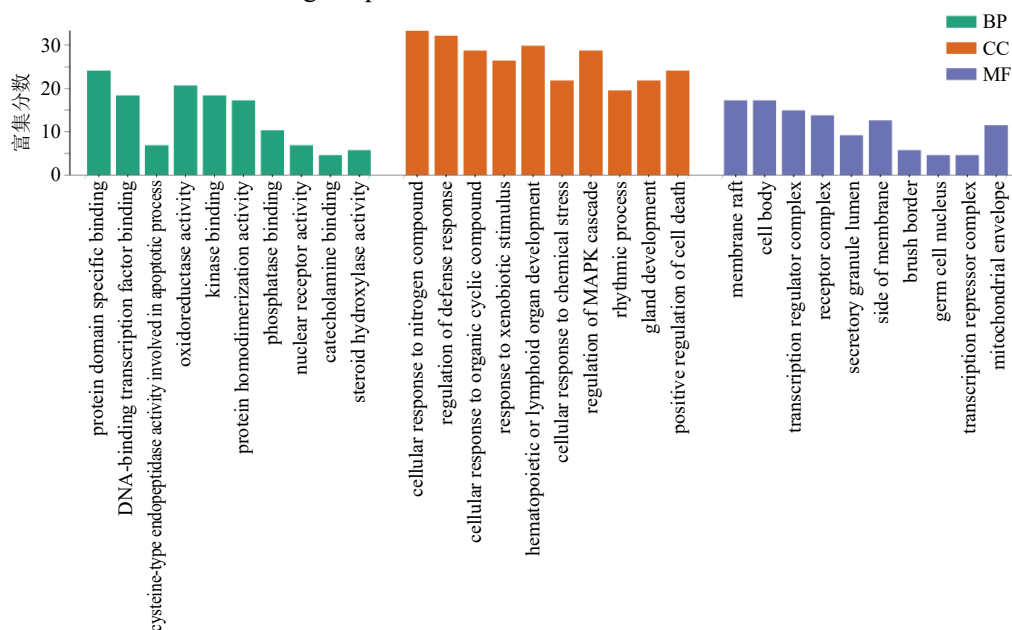


图2 荆防颗粒治疗HUA靶点的GO功能富集分析(前10)

Fig. 2 GO function enrichment analysis of Jingfang Granules in treating HUA target (top 10)

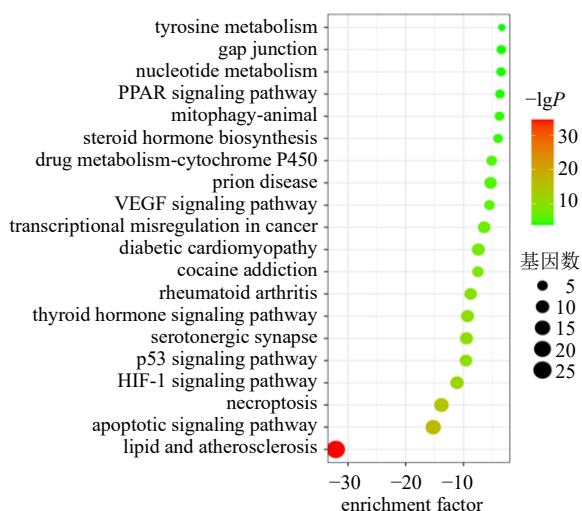


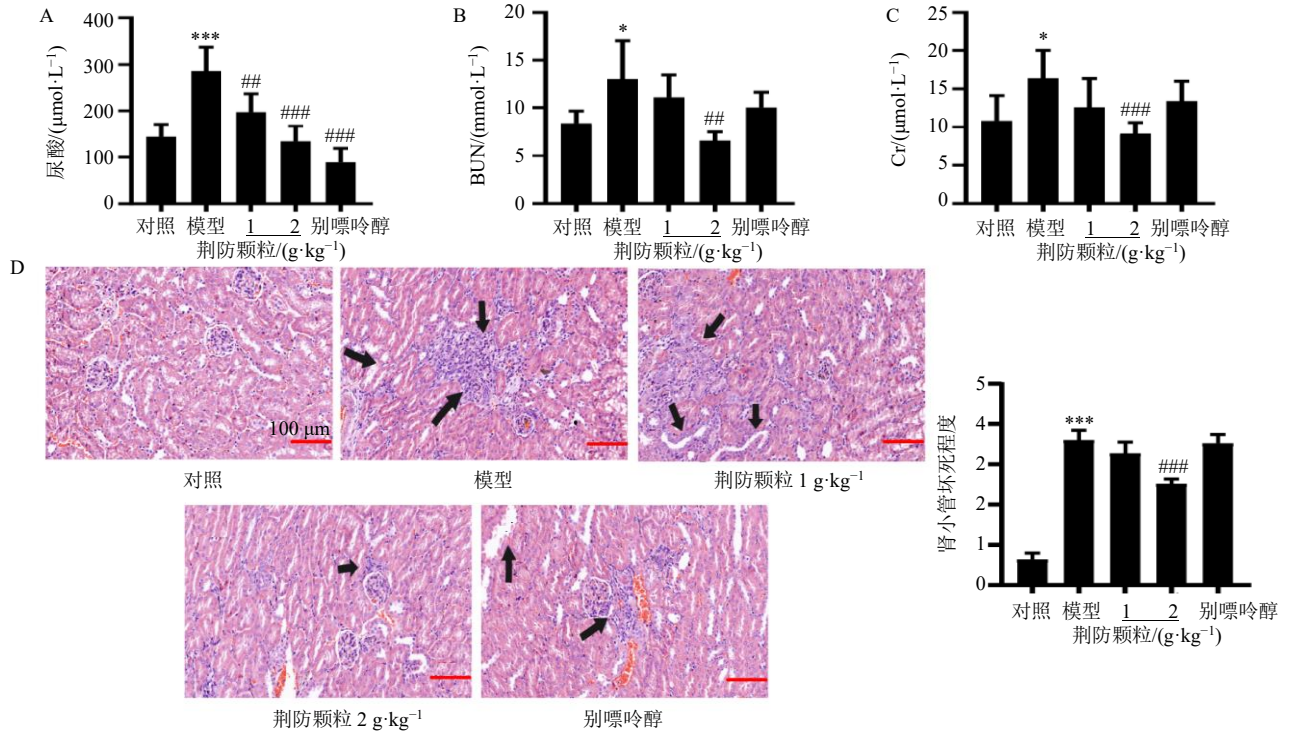
图3 荆防颗粒治疗HUA靶点的KEGG通路富集分析(前20)

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis of Jingfang Granules in treating HUA target (top 20)

3.3 荆防颗粒对HUA小鼠肾脏功能的影响

通过建立氧嗪酸钾诱导的HUA小鼠模型,验证网络药理学分析的结果。如图4-A~C所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中尿酸、BUN和Cr水平均显著升高($P < 0.05$ 、 0.001);与模型组比较,各给药组血清中尿酸水平均显著降低($P < 0.01$ 、 0.001),荆防颗粒高剂量组BUN和Cr水平均显著降低($P < 0.01$ 、 0.001)。

如图4-D所示,对照组小鼠肾小管细胞形态正常,边界清晰;模型组小鼠肾小管严重扩张,伴随炎症细胞浸润;荆防颗粒低剂量组肾皮质炎症细胞一定程度减轻,趋于正常;荆防颗粒高剂量组肾小管形态明显改善、炎症明显减轻;别嘌呤醇组小鼠肾小管管腔扩张明显,肾小球萎缩变形,炎症细胞浸润,与模型组差异不大,说明别嘌呤醇对肾组织



箭头表示肾小管炎性浸润、管腔扩张，肾小球硬化 与对照组比较：**P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001；与模型组比较：#*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001，下图同
arrow indicates inflammatory infiltration of renal tubules, dilation of lumen, glomerulosclerosis **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs control group; #*P*<0.05 ##*P*<0.01 ###*P*<0.001 vs model group, same as below figures

图 4 荆防颗粒对 HUA 小鼠血清中尿酸 (A)、BUN (B)、Cr (C) 水平及肾组织病理的影响 (D) ($\bar{x} \pm s, n = 6$; HE, $\times 400$)
Fig. 4 Effect of Jingfang Granules on levels of serum uric acid (A), BUN (B) and Cr (C) and renal histopathology of HUA mice (D) ($\bar{x} \pm s, n = 6$; HE, $\times 400$)

的保护作用不明显。

3.4 荆防颗粒对 HUA 小鼠肾组织凋亡相关蛋白表达的影响

如图 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠肾组织 Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)，Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，荆防颗粒高剂量组和别嘌醇组 Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 荆防颗粒对 HUA 小鼠肾脏代谢通路的影响

PPI 网络分析中，除参与凋亡及炎症的靶点外，核心靶点 GAPDH 参与糖酵解代谢通路，说明代谢可能在荆防颗粒治疗 HUA 的过程中起到重要作用。基于药效学及 Western blotting 结果，取对照组、模型组、荆防颗粒高剂量组小鼠肾脏代谢组学验证，在正离子和负离子 2 种模式下，主成分分析 (principal component analysis, PCA) 模型显示了对照组、模型组和荆防颗粒高剂量组之间均表现出分离趋势；正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial

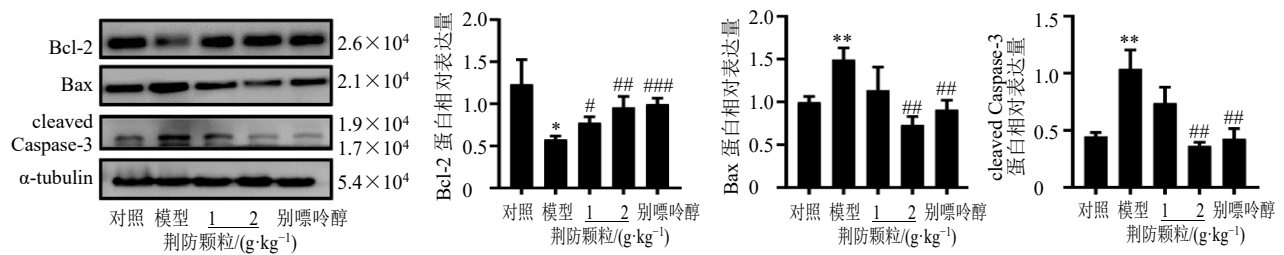


图 5 荆防颗粒对 HUA 小鼠肾组织凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Jingfang Granules on apoptosis-related protein expressions in renal tissue of HUA mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 结果显示, 对照组、模型组和荆防颗粒高剂量组之间的代谢产物显著分离(图 6-A、B)。3 组之间的差异代谢物以热图表示(图 6-C), 可见柠檬酸、磷酸二羟基丙酮等代谢产物含量减少, 给予荆防颗粒后

含量增加。根据差异代谢物采用 KEGG 分析, 结果显示, 代谢相关途径在荆防颗粒治疗 HUA 中发挥了重要作用, 包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢, 糖酵解/糖异生途径, 柠檬酸循环(图 6-D), 与 PPI 网络分析结果一致。

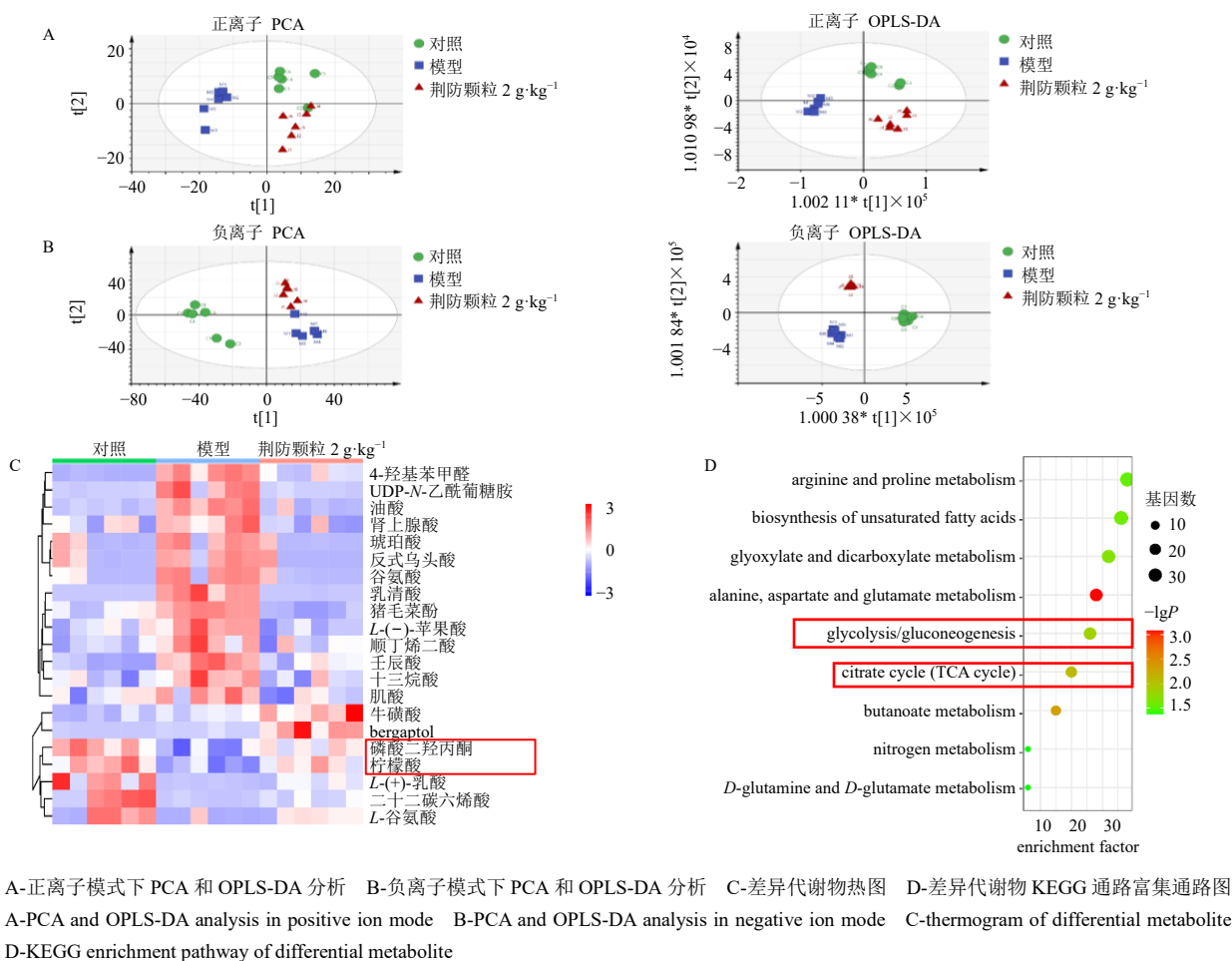


图 6 各组小鼠肾脏组织代谢组学分析

Fig. 6 Renal tissue metabolism analysis of mice in each group

4 讨论

HUA 是由于嘌呤代谢障碍所引起的慢性代谢病, 其流行总体呈逐年升高趋势, 由于其在临床上常与肥胖、2 型糖尿病、高血脂等代谢综合征并发, 给人们的生活带来了较大影响。血尿酸水平持续升高导致尿酸钠晶体沉积于最易受累的靶器官——肾脏, 引发高尿酸性肾病^[13]。目前临床上用于治疗 HUA 的药物靶点相对单一, 肝肾毒副作用较大, 而中医药以其多靶点、多途径的独特优势受到更多关注。荆防颗粒具有改善能量代谢循环、抗炎、抗氧化等作用^[6,8]。研究表明, 荆防颗粒可以通过调控蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /MDm2/p53 通路、

抑制细胞凋亡等途径来减轻马兜铃酸造成的急性肾损伤^[14]。

通过网络药理学综合中药靶点和疾病模型相关靶点揭示中药治疗相关疾病及其机制是目前常用的一种方法^[15]。赵方方等^[16]通过网络药理学探究了薏苡附子败酱散治疗 HUA 的作用机制, 雷欢等^[17]通过网络药理学和分子对接方法探讨香叶木素治疗 HUA 肾病的分子机制。本研究通过网络药理学探究荆防颗粒治疗 HUA 的有效成分、潜在靶点和作用机制, 筛选到荆防颗粒治疗 HUA 的潜在靶点 87 个, 并通过 PPI 网络发现关键靶点包括 GAPDH、TP53、TNF、Caspase-3、IL-6 等, 其中, GAPDH 是参与糖

酵解的一种关键酶,参与重要的代谢途径,代谢异常可能是诱导 HUA 的潜在机制,TP53、Caspase-3 等靶点都表明了荆防颗粒治疗 HUA 的抗凋亡特性。GO 功能和 KEGG 通路富集分析表明,大多数靶点富集在凋亡信号通路、坏死性凋亡、HIF-1 信号通路等。研究表明,尿酸通过氧化应激导致血管内皮细胞功能损伤^[18-19],一方面,这导致了肾小管内皮细胞的凋亡,另一方面,这导致了肾脏处于微缺氧状态,HIF-1 是一种重要的缺氧诱导因子,缺氧可导致脂肪组织中的黄嘌呤氧化酶活性增加,大大增加尿酸分泌,进一步恶化血尿酸水平^[20]。

氧嗪酸钾作为一种尿酸氧化酶抑制剂,其诱导的 HUA 模型较为稳定且易于构建^[21]。在本研究中,荆防颗粒能有效降低 HUA 小鼠模型中的尿酸、BUN、Cr 水平,且能明显改善肾脏病理表现。对网络药理学结果凋亡信号通路进行验证,Western blotting 结果显示,荆防颗粒可以降低 Bax、cleaved Caspase-3 的表达,增加 Bcl-2 的表达,提示荆防颗粒通过减轻细胞凋亡,改善肾脏损害,降低血清尿酸水平。这与曹天佑等^[14]研究中荆防颗粒可显著抑制由炎症导致的细胞凋亡相一致。Bax 和 Bcl-2 表达水平的增加分别发挥了促凋亡和抗凋亡作用,促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白共同决定了细胞凋亡水平^[22-24]。cleaved Caspase-3 是 Caspase-3 切割活化之后的活性形式,是参与细胞凋亡过程中真正执行者^[24]。

对网络药理学结果进行代谢组学验证,根据 HUA 小鼠肾脏代谢热图结果显示,柠檬酸、磷酸二羟基丙酮等代谢产物含量减少,给予荆防颗粒后含量增加。研究表明,柠檬酸合成酶是糖代谢过程重要的限速酶^[25],它决定了线粒体呼吸和细胞生长中三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的产生,调节血管内皮细胞的炎症和凋亡^[26],柠檬酸是三羧酸循环中的关键代谢物,其异常与肾脏疾病密切相关^[27]。磷酸二羟基丙酮是糖代谢过程中重要的中间产物,是联系糖脂代谢的关键产物^[28]。本研究结果提示由氧嗪酸钾导致的 HUA 可能抑制了糖代谢过程,说明 HUA 小鼠体内存在能量代谢的异常。KEGG 结果显示富集通路包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢,糖酵解/糖异生途径,柠檬酸循环,与网络药理学结果一致,提示通过调控代谢可能是荆防颗粒对 HUA 保护作用的关键机制之一

综上所述,本研究基于荆防颗粒的网络药理学,佐以 HUA 小鼠模型及肾脏代谢组学验证,探讨荆

防颗粒降低血清尿酸,改善尿酸性肾病的潜在机制。荆防颗粒治疗 HUA 与缓解细胞凋亡途径有关,通过调节代谢改善 HUA 引起的肾脏损害,证实了网络药理学预测的结果。这些结果对进一步研究荆防颗粒为 HUA 模型小鼠提供了理论依据,也为中医药治疗 HUA 提供了线索和思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dehlin M, Jacobsson L, Roddy E. Global epidemiology of gout: Prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(7): 380-390.
- [2] Lu B L, Lu Q, Huang B J, et al. Risk factors of ultrasound-detected tophi in patients with gout [J]. *Clin Rheumatol*, 2020, 39(6): 1953-1960.
- [3] Shi Y F, Tao M, Ma X Y, et al. Delayed treatment with an autophagy inhibitor 3-MA alleviates the progression of hyperuricemic nephropathy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 467.
- [4] Fathallah-Shaykh S A, Cramer M T. Uric acid and the kidney [J]. *Pediatr Nephrol*, 2014, 29(6): 999-1008.
- [5] 梁红宝, 姜宇珺, 袁晓梅, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的荆防颗粒化学成分研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1697-1708.
- [6] 赵琰, 胡杰, 张贵民, 等. 荆防败毒散的源流与应用 [J]. *环球中医药*, 2020, 13(11): 1996-2002.
- [7] 夏松辰. 李建民教授治疗慢性肾脏病合并高尿酸血症用药规律总结 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [8] 范琢玉, 葛胜宇, 沈光海, 等. 中药防治高尿酸血症作用机制的研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(5): 375-377.
- [9] 赵亚芳, 姜雨乔, 李郁茹, 等. 荆防颗粒对寒冷刺激诱导小鼠机体损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7455-7460.
- [10] 张奎, 陈红英, 马瑜. 荆防败毒散药效学研究 [J]. *河南中医*, 2009, 29(6): 601-602.
- [11] 冯群, 关永霞, 黄志艳, 等. 基于网络药理学和分子对接的荆防败毒散预防新型冠状病毒肺炎的活性成分研究 [J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(6): 485-491.
- [12] 冀霞, 张作娟, 魏莉. 荆防颗粒联合阿奇霉素治疗成人支原体肺炎的临床研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(8): 1703-1706.
- [13] Ponticelli C, Podestà M A, Moroni G. Hyperuricemia as a trigger of immune response in hypertension and chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2020, 98(5): 1149-1159.
- [14] 曹天佑, 屈会化, 董利洋, 等. 荆防颗粒对马兜铃酸 I

- 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5742-5749.
- [15] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [16] 赵方方, 杨雪军. 基于网络药理学探讨薏苡附子败酱散治疗高尿酸血症的作用机制 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(15): 109-115.
- [17] 雷欢, 邓琴, 刘子源, 等. 基于网络药理学和分子对接方法探讨香叶木素治疗高尿酸血症肾病的分子机制 [J]. 山东医药, 2022, 62(14): 9-13.
- [18] Pan Y G, Huang M T, Sekar P, *et al.* Decoy receptor 3 inhibits monosodium urate-induced NLRP3 inflammasome activation via reduction of reactive oxygen species production and lysosomal rupture [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 638676.
- [19] Song C F, Zhao X D. Uric acid promotes oxidative stress and enhances vascular endothelial cell apoptosis in rats with middle cerebral artery occlusion [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(3): BSR20170939.
- [20] Ko J, Kang H J, Kim D A, *et al.* Uric acid induced the phenotype transition of vascular endothelial cells via induction of oxidative stress and glycocalyx shedding [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 13334-13345.
- [21] Bao R X, Chen Q, Li Z, *et al.* Eurycomanol alleviates hyperuricemia by promoting uric acid excretion and reducing purine synthesis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153850.
- [22] 姜永帅, 姜树民, 宋囡, 等. 养胃解毒合剂对脓毒症大鼠肠组织凋亡因子 Bax、Bcl2 和 Caspase3 的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1450-1453.
- [23] 虞玲玲, 刘畅, 全毅红. 当归六黄汤对非肥胖性糖尿病小鼠胰岛炎和 Bax、Bcl-2 表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(8): 1089-1092.
- [24] Jin C N, Miao X, Zhong Y J, *et al.* The renoprotective effect of diosgenin on aristolochic acid I-induced renal injury in rats: Impact on apoptosis, mitochondrial dynamics and autophagy [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 7456-7467.
- [25] Yang Z H, Xue B H, Song G L, *et al.* Effects of citric acid on antioxidant system and carbon-nitrogen metabolism of *Elymus dahuricus* under Cd stress [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 233: 113321.
- [26] Xie Q, Peng J Q, Guo Y, *et al.* microRNA-33-5p inhibits cholesterol efflux in vascular endothelial cells by regulating citrate synthase and ATP-binding cassette transporter A1 [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2021, 21(1): 433.
- [27] Hallan S, Afkarian M, Zelnick L R, *et al.* Metabolomics and gene expression analysis reveal down-regulation of the citric acid (TCA) cycle in non-diabetic CKD patients [J]. *E Bio Medicine*, 2017, 26: 68-77.
- [28] Mehta R, Sonavane M, Migaud M E, *et al.* Exogenous exposure to dihydroxyacetone mimics high fructose induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2021, 62(3): 185-202.

[责任编辑 李亚楠]